茅尾海红树根际土壤可培养细菌多样性及抑菌活性研究

李王靖[1,2]，李蜜[1,2]，徐淑芬[1,2]，黎芳婷[1,2]，易湘茜[1,2]，刘永宏[1,2]，高程海[1,2*]

（1. 广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院，南宁 530200；

2. 广西海洋药物重点实验室，南宁 530200）

摘要：为了挖掘茅尾海红树植物根际土壤可培养细菌资源，研究其抑菌活性。使用培养基对茅尾海 5 种红树植物（红海榄、黄槿、无瓣海桑、桐花树、阔苞菊）的 7 份根际土壤进行富集培养，选用 6 种不同分离培养基对富集样品进行可培养细菌的分离纯化，基于菌株 16S rRNA 基因序列信息进行物种多样性分析。采用纸片法筛选具有抑制表皮葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌活性的菌株。结果表明：（1）从 7 份红树植物根际土壤样品中分离到 120 种可培养细菌，隶属于 35 科 47 属，其中链霉菌属（*Streptomyces* sp.）占菌种总数的 14.2%，同时发现 5 种潜在新菌株。（2）通过抑菌活性初筛，发现 9 种细菌的发酵粗提物对至少一种致病菌具有抑菌活性。综上表明茅尾海红树植物根际土壤可培养细菌多样性丰富，并且部分菌株具有抑制人类致病菌活性。研究结果为新型抗生素的开发利用提供菌种资源。

关键词：红树植物，根际土壤，富集培养，可培养细菌，抑菌活性

中图分类号： **文献标识码：**A 文章编号：

The research of antibacterial activity and culturable bacteria isolate from mangrove rhizosphere soil in Maowei Sea

LI Wangjing[1,2], LI Mi[1,2], XU Shufen[1,2], LI Fangting[1,2], YI Xiangxi[1,2],
LIU Yonghong[1,2], GAO Chenghai[1,2*]

（1. *Institutes of Marine Drugs/Faculty of Pharmacy*, *Guangxi University of Chinese Medicine,* Nanning, 530200, China; 2. *Guangxi Key Laboratory of Marine Drugs,* Nanning, 530200, China）

Abstract: In order to find culturable bacteria resources and antibacterial activity strain in the rhizosphere soil of mangrove plants from the Maowei Sea, the rhizosphere soil of five mangrove plants(*Rhizophora stylosa, Talipariti tiliaceum, Sonneratia apetala, Aegiceras corniculatum,* and *Pluchea indica*) was cultured by enrichment media and then isolated the culturable bacteria. The culturable bacteria were purified by six different isolation media. The diversity of culturable

基金项目：广西自然科学基金创新团队项目（2020GXNSFGA297002）；国家自然科学基金项目（U20A20101；82060640）；“八桂学者”专项经费资助；广西中医药大学桂派中医药传承创新团队资助项目（2022A007）；广西中医药大学高层次人才培育创新团队（2022A007）；广西中医药大学研究生教育创新计划项目（YCSW2022356）[Supported by Natural Science Foundation of Guangxi (2020GXNSFGA297002); Joint fund project for regional innovation and development set up by National Natural Science Foundation (U20A20101; 82060640); Special Fund for Bagui Scholars of Guangxi; GuiPai Traditional Chinese Medicine inheritance and innovation team of Guangxi University of Chinese Medicine Project (2022A007); High-level Talent Inheritance and Innovation Team of Guangxi Traditional Chinese Medicine (2022A007); Project of Guangxi university of Traditional Chinese Medicine Graduate Education Innovation Plan（YCSW2022356）]。

第一作者：李王靖（2000-），硕士研究生，主要从事海洋中药物质基础与产品开发研究，（E-mail）1761158922@qq.com。

***通信作者：**高程海，博士，研究员，硕士生导师，主要从事海洋药用微生物资源与应用研究，（E-mail）1178740043@qq.com。

bacteria was analyzed by the 16S rRNA gene sequence information. Antimicrobial activities (*Staphylococcus epidermidis,* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus,* and *Pseudomonas aeruginosa*) of the culturable bacteria were analyzed by disk diffusion method. The results were as follows: (1) A total of 120 strains were isolated from 7 rhizosphere soil samples of mangrove plants which could be classified into 35 families and 47 genera, among which 5 potential new species were obtained. The dominat genus were *Streptomyces* (14.2%). (2) It was found that the crude extracts of 9 strains had antibacterial activity against at least one pathogen. The results indicate that there are abundant culturable bacteria and potential new antibiotics resources in the mangrove rhizosphere soils from the Maowei Sea.
Key words: mangrove plants, rhizosphere soil, enrichment culture, cultured bacteria, antibacterial activity

红树植物受潮汐活动影响长期被海水周期性淹没，独特的生境蕴藏丰富且特殊的微生物资源，由于生长环境特殊及现有分离技术手段有限，仅 1%的红树林微生物资源可通过现有分离方法获得（李蜜等，2020）。广西茅尾海红树林地处亚热带海湾，海水温度较高且盐度较低，适宜桐花树和秋茄等乡土红树植物生长，近几年从国外引入大量无瓣海桑（黄祥娟等，2022），具有生态系统复杂、微生物群落结构特殊和活性微生物多样性丰富等特征。颜栋美等（2018）从茅尾海无瓣海桑根际土壤中，分离获得 57 株细菌，其中有 1 株潜在新菌种，50.88%的菌株对甘蔗鞭黑粉菌具有抑制作用。郑红芸等（2019）从茅尾海红树植物根际淤泥中获得 244 株放线菌，60 株隶属链霉菌属，4 株为潜在新物种。抑菌实验结果显示 83 株放线菌中有 59 株对多种致病菌具有抑制作用，包括 1 株潜在新菌，6 株细菌表现出广谱的抑菌活性。叶景静等（2018）使用 8 种培养基从 3 种红树植物中分离获得 261 株细菌，其中 3 株为潜在新物种，83 株放线菌中有 10 株具有广谱抑菌活性。Lu 等（2019）从茅尾海红树植物土壤的 1 株小单孢菌中分离得到对耐药大肠杆菌和药敏肺炎克雷伯菌有较强抑制活性的 7 个喹诺啉类抗生素，包括 quinomycin A, quinomycin monosulfoxide 和 5 个新化合物。Li 等（2019）和 Gong 等（2018）从茅尾海红树林分别发现 5 株具有产生核糖体抑制剂的细菌和 16 株含有 I 型聚酮合酶和 II 型聚酮合成酶的菌株。由此可见，茅尾海红树林菌株资源丰富，部分菌株对多种致病菌有抑菌效果且活性显著，有开发成为抗生素的潜力。

富集培养作为一种分离未培养和难培养微生物的方法，被验证能够有效促进海洋细菌从休眠状态下复苏（王肖慢等，2019），分离得到多样性丰富的微生物。该方法已在海洋沉积物中被应用于富集微生物，结果显示富集培养后同一样品相比传统培养方法微生物物种多样性提高 2 倍以上（Mu et al.，2018）。目前还未有文献报道使用富集培养法富集红树林根际土壤微生物，因此本研究使用该方法富集微生物提高其物种多样性，具有较大研究价值。

抗生素作为人类对抗感染性疾病的有效武器，在人类社会中扮演着重要角色。抗生素在农业、医疗等各个领域的滥用，促使了致病菌耐药性的产生，推动了抗生素耐药危机爆发（王旭阳等，2020），人类将面临无有效抗生素可用的“后抗生素时代”。预计到 2050 年，抗生素耐药危机每年可能造成约 1 000 万人死亡（El-Kurdi et al.，2020）。2014—2019 年临床研究结果显示，金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和铜绿假单胞菌是临床上最为常见的人体致病菌，对当前常见的抗生素具有耐药性（全国细菌耐药监测网，2021）。因此，开发新型有效的抗生素迫在眉睫，而寻找能够产生新型抗生素的菌株是前提条件。本研究以茅尾海不同种类红树植物根际土壤为研究对象，首次尝试富集培养法分离共生细菌，纸片法对菌株代谢产物粗提物进行抑菌活性筛选，拟探讨以下问题：（1）富集培养法能否从红树植物根际土壤中分离得到多样性丰富的微生物；（2）富集培养法能否有效从红树植物根际土壤中分离到未培养和难培养微生物；（3）红树林环境样品是否存在具有抑菌活性的微生物资源。以

期挖掘更多潜在新物种和具有抑制人类致病菌活性的微生物资源，为抗生素的开发提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 根际土壤样品的采集

2021 年 9 月于茅尾海红树林自治区级自然保护区采集红树植物红海榄、黄槿、无瓣海桑、桐花树、阔苞菊的根际泥土样本。采集 5~10 cm 深度的红树植物根际土壤，除去石块和断根等杂质后装入无菌采样袋存放于 4 ℃保温箱，带回实验室进行菌株分离实验。样品采集信息详情见表 1。

表 1 茅尾海红树根际土壤样品采集信息

Table 1 Information of collected mangrove rhizosphere soil samples from the Maowei Sea

样品编号 Code of sample	土壤样品 Rhizosphere soil sample	经纬度 Longitude and latitude
A	红海榄土壤（*R. stylosa* rhizosphere soil）	108° 34′ 43″ E、21° 52′ 10″ N
B	黄槿土壤（*T. tiliaceum* rhizosphere soil）	108° 35′ 25″ E、21° 51′ 38″ N
C	无瓣海桑土壤（*S. apetala* rhizosphere soil）	108° 35′ 45″ E、21° 51′ 37″ N
D	无瓣海桑土壤（*S. apetala* rhizosphere soil）	108° 34′ 44″ E、21° 52′ 9″ N
E	桐花树土壤（*A. corniculatum* rhizosphere soil）	108° 34′ 44″ E、21° 52′ 35″ N
F	桐花树土壤（*A. corniculatum* rhizosphere soil）	108° 34′ 43″ E、21° 52′ 10″ N
G	阔苞菊土壤（*P. indica* rhizosphere soil）	108° 34′ 52″ E、21° 52′ 5″ N

1.1.2 检定菌来源

表皮葡萄球菌（*S. epidermidis*）和铜绿假单胞菌（*P. aeruginosa*）由广东省微生物研究所提供。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（Methicillin-resistant *S. aureus*）由广西中医药大学海洋药物研究院提供。

1.1.3 主要试剂及仪器设备

二甲基亚砜（DMSO）和甲醇为国产分析纯，购于西陇科学股份有限公司。聚合酶链式反应引物（27F, 1492R）购于北京全式金生物技术有限公司。Chelex-100 树脂购于美国 BioRad 公司。Taq PCR Master Mix(2 ×)购于康为世纪生物科技股份有限公司。

1.1.4 培养基

富集培养基：氯化铵 1.0 g，乙酸钠 2.0 g，七水硫酸镁 0.20 g，酵母提取物 0.20 g，蛋白胨 0.20 g，EDTA-Na2 1.0 g，丙酮酸钠 1.1 g，海水 1 L，灭菌后另加无菌的 10% $NaHCO_3$ 和 2% KH_2PO_4 溶液(10 mL・L^{-1})。

分离培养基：参考李蜜等（2020）使用 2216E 琼脂培养基（2216E）；2216E/10 培养基；酪氨酸-天冬酰胺培养基(P7)；改良 ISP5 培养基(M7)；Am6-1 培养基；燕麦培养基(P3)。灭菌后添加重铬酸钾使其终浓度为 25 mg・L^{-1}。纯化及保藏培养基：ISP2 和 LB 固体培养基。发酵培养基：AM3 和 AM6 液体培养基。检定菌培养基：LB 固体培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 土壤样品的处理

参照王肖慢等（2019）方法，取 20 g 土壤加入灭菌后的 500 mL 液体富集培养基（Mu et al.，2018）中，震荡混匀，置于 28 ℃恒温箱静置培养，分别于第 0 天和第 7 天取原液、10^{-1} 和 10^{-3} 稀释液，在 6 种不同的分离培养基上涂布培养（李蜜等，2020）。

1.2.2 菌株的分离纯化和保藏

参考李蜜等（2020）方法，将涂布后的培养基置于 28 ℃恒温培养箱培养，分别于第 5、17、41 天从涂布培养基中挑选单一菌落，采用三区划线法在 ISP2 培养基上分离纯化，编号并记录其生长培养基类型和形态特征。参考李蜜等（2020）将纯化的菌株保藏于 25%（M/M）无菌甘油管中。

1.2.3 菌株的鉴定

纯化的菌株根据形态特征进行排重，采用 Chelex-100 法（周双清等，2010）对已排重细菌的基因组 DNA 进行提取，参照 Walsh 等（1991）的方法对细菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增。将扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。经 SeqMan 软件整理的 16S rRNA 基因测序结果，并在数据库 EzBioClou（http://www.eztaxon.org/）进行相似性比对，根据 16S rRNA 相似度对菌株的种属进行确定。

1.2.4 可培养细菌活性筛选

1.2.4.1 可培养细菌粗提物的提取

参考李蜜等（2020）方法，将对数生长期的菌株分别接种于 100 mL AM3 和 AM6 液体培养基，在 28 ℃、180 r · min^{-1} 恒温振荡培养箱中发酵 7 d。用等体积的乙酸乙酯萃取发酵液 3 次，取乙酸乙酯萃取溶液进行减压旋蒸，挥干得到细菌粗提物，粗提物置于 4 ℃环境保存。

1.2.4.2 细菌粗提物的抑菌实验

参考郑红芸等（2019）的方法，将致病菌接种于 50 mL LB 液体培养基中，在 37 ℃、180 r · min^{-1} 的摇床培养 7 h 获得种子液。种子液加入到灭菌后冷却至 50 ℃左右的 LB 固体培养基中，稀释至 0.2%浓度。充分振摇后倾注到培养皿中，待其冷却后备用。

参考叶景静等（2018）方法。使用甲醇溶解细菌粗提物，最终配制成 20 mg · mL^{-1} 溶液，取 15 μL 分多次滴加到直径 6 mm 的无菌滤纸片中。等体积甲醇、DMSO、空白 AM3 培养基、空白 AM6 培养基的滤纸片作阴性对照。以分别加入 3 μL 三甲氧苄氨嘧啶和环丙沙星的滤纸片作为阳性对照。37 ℃恒温培养箱培养 24 小时，观察抑菌结果。

2 结果与分析

2.1 可培养细菌多样性分析

使用 6 种分离培养基从 7 份红树植物根际土壤样品中分离到 266 株可培养细菌。根据菌株的形态特征和生长情况进行排重，再通过 16S rRNA 基因序列测序比对，鉴定获得 120 种细菌，包括放线菌门、厚壁菌门和变形菌门，隶属于 35 科 47 属，分离情况如表 2 所示。红树植物根际土壤中放线菌资源丰富，分离得到 49 种放线菌占分离菌株总数的 40.8%。链霉菌属（*Streptomyces* sp.）分离获得最多，共 17 种，占细菌物种总数的 14.2%。其次为芽孢杆菌属（*Bacillus* sp.），共获得 9 种。分离得到 5 种潜在新菌，与有效发表菌株相比较最高相似度均低于 97.00%，其中 *Marmoricola silvestris* GXIMD2799、*Actinomycetospora chiangmaiensis* GXIMD3297、*Shewanella mangrovi* GXIMD2807、*Fulvimarina manganoxydans* GXIMD2794 均来源于桐花树的根际土壤，详细物种信息见表 3。

表 2 茅尾海红树林样品根际土壤可培养细菌

Table 2 Culturable bacteria of mangrove rhizosphere soil from the Mawei Sea

门 Phylum	科 Family	属 Genus	种数 Number of species
放线菌门 Actinobacteria	纤维单胞菌科 Cellulomonadaceae	纤维单胞菌属 *Cellulomonas*	1
	Oerskoviaceae	厄氏菌属 *Oerskovia*	1
	原小单孢菌科 Promicromonosporaceae	纤维菌属 *Cellulosimicrobium*	1

	去甲基醌菌科 Demequinaceae	去甲基醌菌属 *Demequina*	3
	动孢菌科 Kineosporiaceae	动孢囊菌属 *Kineosporia*	1
	微杆菌科 Microbacteriaceae	壤霉菌属 *Agromyces*	3
		短小杆菌属 *Curtobacterium*	3
		细杆菌属 *Microbacterium*	4
	微球菌科 Micrococcaceae	考克氏菌属 *Kocuria*	1
	小单孢菌科 Micromonosporaceae	小单孢子菌属 *Micromonospora*	6
	戈登氏菌科 Gordoniaceae	戈登氏菌属 *Gordonia*	2
	分枝杆菌科 Mycobacteriaceae	分枝杆菌属 *Mycobacterium*	1
	诺卡氏菌科 Nocardiaceae	诺卡菌属 *Nocardia*	2
		红球菌属 *Rhodococcus*	1
	类诺卡氏菌科 Nocardioidaceae	*Marmoricola*	1
	伪诺卡氏菌科 Pseudonocardiaceae	放线孢菌属 *Actinomycetospora*	1
	链霉菌科 Streptomycetaceae	链霉菌属 *Streptomyces*	17
厚壁菌门 Firmicutes	芽胞杆菌科 Bacillaceae	嗜碱芽孢杆菌属 *Alkalihalobacillus*	1
		芽孢杆菌属 *Bacillus*	9
		细胞杆菌属 *Cytobacillus*	1
		虚构芽孢杆菌属 *Fictibacillus*	2
		Mesobacillus	1
		Metabacillus	1
		Priestia	4
		Rossellomorea	6
		枝芽孢菌属 *Virgibacillus*	1
	微小杆菌科 Exiguobacterium	微小杆菌属 *Exiguobacterium*	2
	类芽孢杆菌科 Paenibacillaceae	类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*	2
	动球菌科 Planococcaceae	*Metasolibacillus*	1
	葡萄球菌科 Staphylococcaceae	葡萄球菌属 *Staphylococcus*	1
	肠球菌科 Enterococcaceae	肠球菌属 *Enterococcus*	1
变形菌门 Proteobacteria	橙单胞菌科 Aurantimonadaceae	*Fulvimarina*	2
	Stappiaceae	*Roseibium*	1
	红细菌科 Rhodobacteraceae	*Salipiger*	1
	赤杆菌科 Erythrobacteraceae	*Qipengyuania*	1
	产碱菌科 Alcaligenaceae	产碱杆菌属 *Alcaligenes*	1
	丛毛单胞菌科 Comamonadaceae	*Curvibacter*	2
	希瓦氏菌科 Shewanellaceae	希瓦氏菌科属 *Shewanella*	7
	微泡菌科 Microbulbiferaceae	微泡菌属 *Microbulbifer*	2
	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	肠杆菌属 *Enterobacter*	3
		曼格洛杆菌 *Mangrovibacter*	1
	欧文氏菌科 Erwiniaceae	泛菌属 *Pantoea*	1
	莫拉氏菌科 Moraxellaceae	不动杆菌属 *Acinetobacter*	5
	盐单胞菌科 Halomonadaceae	盐单胞菌属 *Halomonas*	1
	海洋螺菌科 Oceanospirillaceae	海细菌属 *Marinobacterium*	1
	假单胞菌科 Pseudomonadaceae	假单胞菌属 *Pseudomonas*	5
	弧菌科 Vibrionaceae	弧菌属 *Vibrio*	4

表 3 潜在疑似新物种

Table 3 Potential new strains

菌株编号 Strain code	样品来源 Source	相近种 Origin	相似度 Similarity(%)	GenBan 登录号 GenBanLogin Number
GXIMD2799	E	*Marmoricola silvestris*	96.02	OP646774
GXIMD3297	E	*Actinomycetospora chiangmaiensis*	96.61	OP646775
GXIMD2794	F	*Fulvimarina manganoxydans*	95.95	OP646776
GXIMD2807	F	曼氏希瓦氏菌 *Shewanella mangrovi*	95.62	OP646777
GXIMD2792	G	舟山海洋杆菌 *Marinobacterium zhoushanense*	96.96	OP646778

2.2 不同样品和培养基的获得菌株种类分析

经过富集培养处理后，不同样品获得可培养细菌多样性差异明显，样品 B（黄槿根际土壤）中分离得到的菌种数目最多 43 种，优势菌属为微杆菌属（*Microbacterium* sp.）。其次样品 F（桐花树根际土壤）分离得到 35 种细菌，链霉菌属（*Streptomyces* sp.）最为丰富。样品 E（桐花树根际土壤）中分离得到的菌种数目最少，而放线菌占比最高（57.89%）。此外，各样品中均能分离得到芽孢杆菌属（*Bacillus* sp.）和希瓦氏菌属（*Shewanella* sp.）菌株。不同样品菌株分离情况如图 1 所示。

不同培养基存在营养成分差异，因此分离得到的细菌物种多样性差异显著。就菌种多样性而言，P7 培养基分离效果最好，获得 60 种细菌，隶属于 18 个属，其中 56.67%为放线菌，链霉菌属（*Streptomyces* sp.）最为丰富。P3 培养基和 2216E 培养基分离得到菌株数目最少，分别得到 11 种和 14 种菌，隶属于 10 个属和 12 个属，优势菌属为链霉菌属（*Streptomyces* sp.）。与 2216E 培养基相比，具有相同种类成分的 2216E/10 培养基分离得到的菌株种类更为多样，共获得 35 种菌，隶属于 20 个属。此外，发现壤霉菌属（*Agromyces* sp.）、芽孢杆菌属（*Bacillus* sp.）、链霉菌属（*Streptomyces* sp.）和 *Rossellomorea* sp.在 6 种分离培养基中均有生长。不同培养基菌株分离情况如图 2 所示。

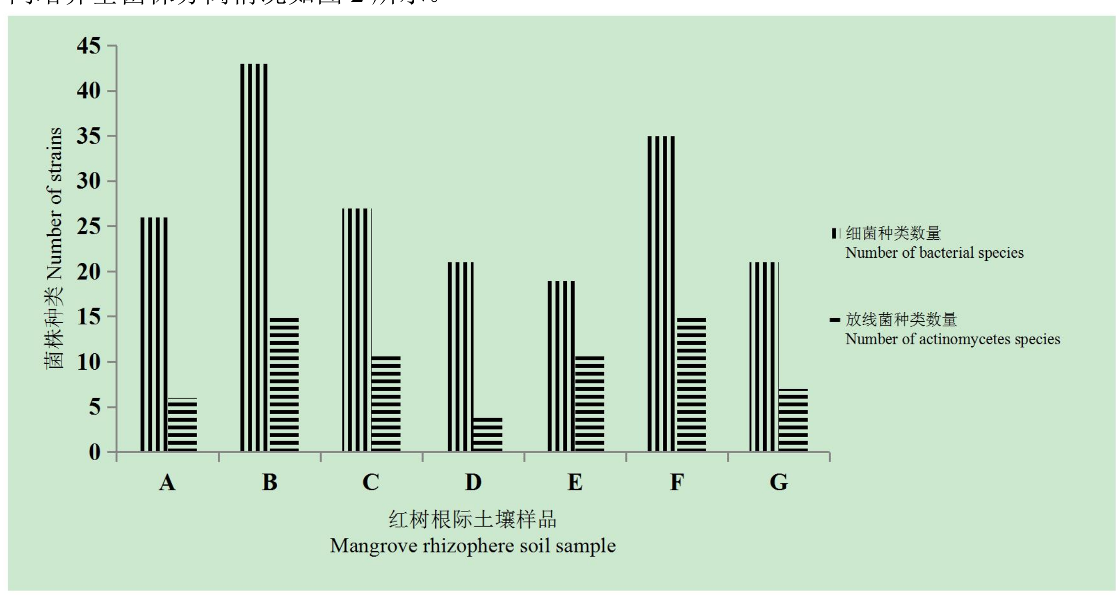


图 1 不同茅尾海红树根际土壤分离得到的细菌种类

Fig. 1 Bacteria isolated from different mangrove rhizosphere soil of the Maowei Sea

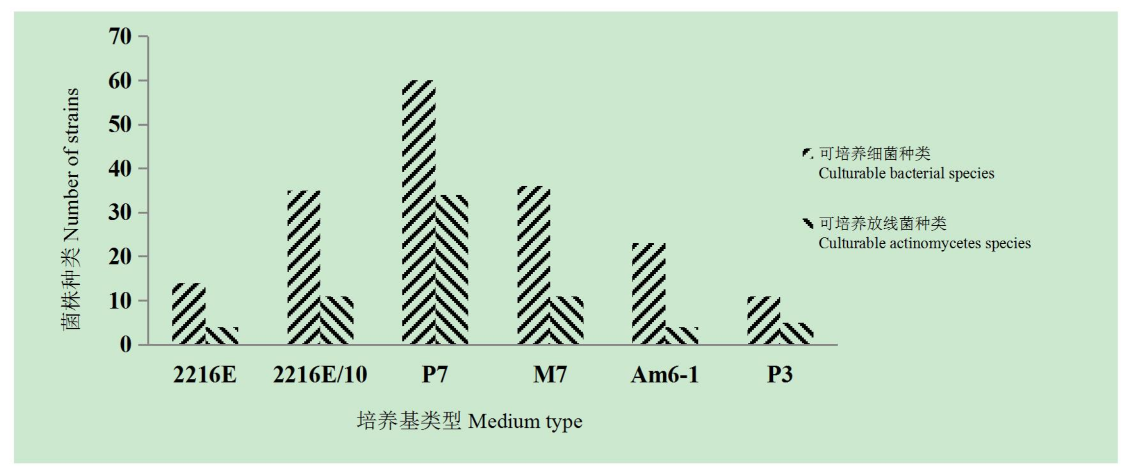


图 2 不同培养基分离得到的细菌总数

Figure 2 Total number of bacteria isolated from different media

2.3 细菌发酵产物的抑菌实验结果与分析

9 种菌株对至少一种致病菌有抑菌活性，其中 7 种分离自 P7 培养基。菌株 *Streptomyces hyderabadensis* GXIMD3077、*Agromyces kandeliae* GXIMD3249、*Streptomyces sundarbansensis* GXIMD3242、*Curtobacterium luteum* GXIMD3684、*Micromonospora rifamycinica* GXIMD3699 对 3 种人体致病菌均具有抑制活性。*Gordonia didemni* GXIMD3861、*Shewanella algae* GXIMD3241 对 MRSA 和铜绿假单胞菌具有抑制活性。*Nocardia arthritidis* GXIMD3088、GXIMD3297 对铜绿假单胞菌具有一定的抑制活性。放线菌在抑菌活性研究方面有较大潜力，筛选发现 8 种活性菌株为放线菌，2 种来源于链霉菌属（*Streptomyces* sp.），其余 6 种菌株分别来自壤霉菌属（*Agromyces* sp.）、短杆菌属（*Curtobacterium* sp.）、小单孢菌属（*Micromonospora* sp.）、戈登氏菌属（*Gordonia* sp.）、诺卡氏菌属（*Nocardia* sp.）和孢菌属（*Actinomycetospora* sp.），其中 GXIMD3297 为潜在新菌，对铜绿假单胞菌具有一定的抑菌活性。同一菌株不同发酵培养基其代谢产物抑菌活性检测结果不同，部分菌株的抑菌活性只存在于其中一种发酵培养基的代谢产物，9 株活性菌株中 GXIMD3699 和 GXIMD3061 在 2 种发酵培养基的代谢产物均有抑菌活性。抑菌活性实验结果如表 4 和图 3 所示。

表 4 具有抑制三种人类致病菌活性的红树林根际土壤可培养菌株

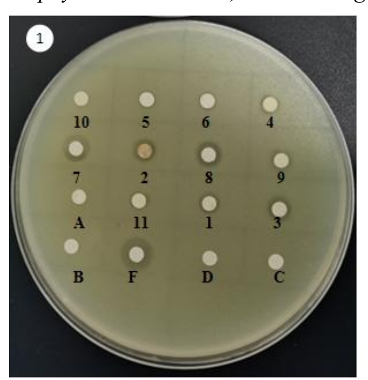
Table 4 The culturable strains of mangrove rhizosphere soil with inhibitory activity against three human pathogenic bacteria

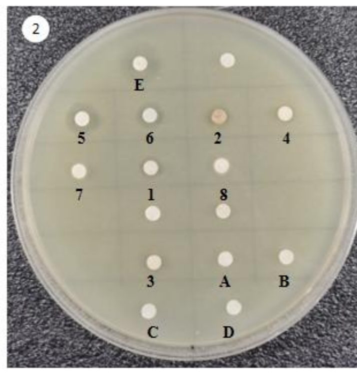
粗提物 Crude extract	编号 Number	分离培养基 Isolation medium	相近种 Origin	抑菌结果 bacteriostasis results		
				PA	MRSA	*SE*
GXIMD3077(A)	1	P7	海德拉巴链霉菌 *Streptomyces hyderabadensis*	+	+	+
GXIMD3249(B)	2	M7,2216E/10	秋茄壤霉菌 *Agromyces kandeliae*	+	+	+
GXIMD3242(A)	3	P7	孙达本斯链霉菌 *Streptomyces sundarbansensis*	+	+	+
GXIMD3684(B)	4	Am6-1,P7	藤黄短小杆菌 *Curtobacterium luteum*	+	+	+
GXIMD3699(A)	5	2216E/10	利福霉素小单孢菌 *Micromonospora rifamycinica*	+	+	+
GXIMD3699(B)	6	2216E/10	*Micromonospora rifamycinica*	+	+	+

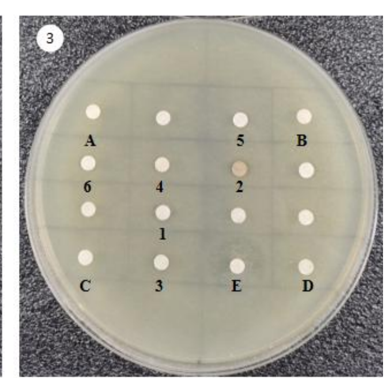
GXIMD3861(A)	7	P7	*Gordonia didemni*	+	+	—
GXIMD3861(B)	8	P7	*Gordonia didemni*	+	+	—
GXIMD3241(B)	9	P7	海藻希瓦氏菌 *Shewanella algae*	+	+	—
GXIMD3088(B)	10	P7	*Nocardia arthritidis*	+	—	—
GXIMD3297(A)	11	P7	*Actinomycetospora chiangmaiensis*	+	—	—

注：+. 有抑菌圈； 一. 无抑菌圈； ***SE***. 表皮葡萄球菌； **MRSA**. 耐甲氧西林金黄色普通球菌； ***PA***. 铜绿假单胞菌。

Note: +. a inhibition zone; 一. no bacteriostatic zone; ***SE***. *S. epidermidis*; **MRSA**. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; ***PA***. *P. Aeruginosa.*







1. 铜绿假单胞菌； **2**. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌； **3**. 表皮葡萄球菌； **A**. AM3； **B**. AM6； **C**. 甲醇； **D**. 二甲基亚砜； **E**. 三甲氧苄氨嘧啶； **F**. 环丙沙星。

1. *P. Aeruginosa*; **2**. MRSA; **3**. *S. epidermidis*; **A**. AM3 medium; **B**. AM6 medium; **C**. Methanol; **D**. means dimethyl sulfoxide; **E**. TMP; **F**. CPFX.

图 3 3 种人体致病菌抑菌活性实验结果图

Figure 3 Results of antibacterial activity from 3 kinds human pathogenic bacteria

3 讨论

茅尾海红树林海水盐度较低且红树植物种类多样，其根际土壤微生物群落复杂。统计2015—2021 年文献报道，发现通过传统分离方法从茅尾海红树林土壤分离得到的潜在新菌（<98.65%）比例为 2.34% (张荣灿等，2015；吴家法等，2017；颜栋美等，2018；叶景静等，2018；石松标等，2018；郑红芸等，2019)。由于海洋环境难以模拟、某些微量的营养物质缺失、不同微生物之间的生物联系切断等制约条件导致部分微生物为避免外界环境威胁，启动自我保护机制而陷入休眠状态（王保军等，2013），因此在实验室分离得到的菌株种类极其有限。为分离未培养和难培养微生物，本研究采用富集培养法富集土壤样品中的微生物，以期复苏休眠菌株，提高微生物多样性，获得更多潜在新物种，最终分离得到 5 株相似度低于 97.00%的菌种，潜在新菌比例为 4.17%。富集培养所用培养基是在寡营养培养基的基础上添加了丙酮酸钠和乙酸钠，为合成细菌生长所需的丙酮酸和乙酰辅酶 A 提供底物，进而增强细菌基础代谢，促进细菌复苏，同时降解富集过程中细菌产生的有害代谢产物，在富集的过程中打破部分微生物的受胁迫状态（Mu et al.，2018；王肖慢等，2019），使其可以正常生长，从而尽可能多的分离出未培养和难培养细菌。

本研究在富集培养的基础上，采用了 6 种分离培养基对茅尾海 7 份不同地点的红树植物根际土壤进行细菌的分离纯化，共获得到 120 种细菌，隶属于 35 科，47 属，链霉菌属（*Streptomyces* sp.）数量最多，优势属与叶景静等（2018）、郑红芸等（2019）研究结果相

同。不同培养基的菌株分离结果显示，P7 培养基（甘油、L-酪氨酸、L-天冬酰胺、复合盐溶液）分离得到的菌株多样性最丰富，共分离得到 60 种细菌，占总菌种数的 50.00%，包括 7 种活性菌株。P3 和 2216E 培养基营养丰富，分离效果逊于寡营养的 P7 培养基。说明红树林特殊生境中，较多微生物的生长需要补充氨基酸，且要求培养基微量元素多样而非营养丰富，P7 培养基可作为红树植物根际土壤微生物分离的参考培养基。

放线菌为抗生素的主要来源，为应对抗生素耐药危机提供重要菌种资源。抑菌活性筛选结果显示有 9 种细菌具有抑菌活性，其中 8 种为放线菌。GXIMD3077、GXIMD3249、GXIMD3242、GXIMD3684、GXIMD3699 对三种人体致病菌均有一定的抑制作用。GXIMD3249 为秋茄壤霉菌（*Agromyces kandeliae*），最早发现于 2020 年（Wang et al., 2020），目前未见有抑菌活性方面的报道。GXIMD3699 和 GXIMD3061 在两种发酵培养基的代谢产物均有抑菌活性，其余活性菌株只筛选到一种培养基的代谢产物具有活性，说明培养基的组成变化对菌株的次级代谢产物合成有一定的影响（孙志敏等，2022）。铜绿假单胞菌是临床上常见的病原菌，容易感染人体导致肺炎、菌血症和败血症等，对于免疫力低下人群具有严重的危害。其外膜通透性较低，且能产生碳青霉烯酶和多种β-内酰胺酶对抗生素进行灭活，对多种常用抗菌药物具有明显耐药性（岳卓等，2020）。本研究分离得到一株最高相似度为 96.61%的稀有放线菌 GXIMD3297(*Actinomycetospora chiangmaiensis*)，为潜在新物种，该菌在 AM6 液体培养基中的代谢产物对铜绿假单胞菌具有一定的抑制作用。据文献报道，该属（*Actinomycetospora* sp.）菌株仅在兰花（Sakdapetsiri et al., 2018）、地衣（Yamamura et al., 2011）和土壤(Zhang et al., 2014)中被发现，目前暂无关于该属抑菌活性的相关研究，因此本研究筛选到的潜在新物种 GXIMD3297 具有深入开发研究的潜力。下一步计划开展潜在新菌的多项分类鉴定及活性菌株的条件优化、活性化合物分离纯化等，为新型抗生素的研发提供科学基础。

4 结论

本研究为富集培养方法在红树植物根际土壤微生物分离的应用提供参考。从茅尾海红树植物根际土壤中分离得到 120 种细菌，包括 5 种潜在新物种，说明茅尾海红树植物根际土壤蕴藏的微生物资源丰富，具有较大的开发价值。抑菌实验结果显示，8 种放线菌对多种致病菌表现出抑制作用，其中包括 1 株潜在新菌。说明海洋放线菌是新型抗生素生产来源的潜力菌株，且具有较大研究潜力。

参考文献：

China Antimicrobial Resistance Surveillance System, 2021. Antimicrobial resistance of bacteria: surveillance report from China Antimicrobial Resistance Surveillance System in 2014-2019[J]. Chin J Infect Control, 20(1): 15-30. [全国细菌耐药监测网，2021．全国细菌耐药监测网 2014—2019 年细菌耐药性监测报告[J]．中国感染控制杂志，20（1）：15-30．]

EL-KURDI N, ABDULLA H, & HANORA, A, 2020. Anti-quorum sensing activity of some marine bacteria isolated from different marine resources in Egypt[J]. Biotechnol Lett, 43(2): 455-468.

GONG B, Chen S, Lan W, et al., 2018. Antibacterial and antitumor potential of actinomycetes isolated from mangrove soil in the Maowei Sea of the southern coast of China[J]. IJPR, 17(4): 1339.

HUANG XJ, LU L, WENG PY, 2022. Construction of Mangrove Reserve and Countermeasures of ecological environment protection in Maoweihai, Guangxi[J]. Agric Technol, 42(2):99-101.[黄祥娟，陆禄，翁培耀，2022．浅谈广西茅尾海红树林保护区建设及生态环

境保护对策[J]. 农业与技术，42（2）：99-101．]
LI FN, Liu SW, Lu QP, et al., 2019. Studies on antibacterial activity and diversity of cultivable actinobacteria isolated from mangrove soil in Futian and Maoweihai of China[J]. Evid Based Complement Altern, 6(9): 1-11.
LI M, GAO CH, JIANG S, et al., 2020. Diversity and anti-aging activity of endophytic bacteria from true mangrove plants collected from the west coast of Hainan[J]. Guihaia, 21(3): 311-319. [李蜜，高程海，姜舒，等，2020．海南西海岸真红树内生细菌多样性及其延缓衰老活性研究[J]．广西植物，21（3）：311-319．]
LI M, HOU SS, YIN JL, et al., 2020. Diversity and nematicidal activity of endophytic bacteria from mangrove plants collected from Beibu Gulf coast at Xuwen[J]. Guihaia, 40(3): 301-310. [李蜜，候师师，银江林，等，2020．北部湾徐闻海域红树内生细菌物种多样性及其杀线虫活性研究[J]．广西植物，40（3）：301-310．]
LU Q P, Ye J J, Huang Y M, et al., 2019. Exploitation of potentially new antibiotics from mangrove actinobacteria in Maowei sea by combination of multiple discovery strategies[J]. Antibiot, 8(4): 236.
MU DS, LIANG QY, WANG XM, et al., 2018. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing[J]. Microbiome, 6(1): 1-15.
SAKDAPETSIRI C, NGAEMTHAO W, SURIYACHADKUN C, et al., 2018. Actinomycetospora endophytica sp. nov., isolated from wild orchid (*Podochilus microphyllus* Lindl.) in Thailand[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 68(9): 3017-3021.
SHI SB, YANG LF, JIANG MG, et al., 2018. A comparison of actinomycetes isolation medium with samples from mangrove habitats in Maowei Sea. Guangxi Beibu Gulf[J]. Microbiol China, 45(11): 2331-2340.[石松标，杨立芳，姜明国，等，2018．广西北部湾茅尾海红树林生境放线菌分离培养基的比较[J]．微生物学通报，45（11）：2331-2340．]
SUN ZM, LI YL, SHEN ZZ, et al., 2022. Fermentation condition optimizationand stability of Streptomyces S-03strain, a *Phytophthora cinnamomi* antagonist[J]. Life Sci Res, 26(3): 256-263.[孙志敏，李昱龙，沈紫竹，等，2022．樟疫霉拮抗链霉菌 S-03 菌株发酵条件优化及其稳定性探究[J]．生命科学研究，26（3）：256-263．]
WALSH PS, METZGER DA, HIGUSHI R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. Bio Technol, 10(4): 506-513.
WANG BJ, LIU SJ, 2013. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiol China, 40(1): 6-17. [王保军，刘双江，2013．环境微生物培养新技术的研究进展[J]．微生物学通报，40（1）：6-17．]
WANG R, Ye Y, HUANG Y, et al, 2020. Agromyces kandeliae sp. nov., isolated from rhizosphere soil of Kandelia candel in a mangrove[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 70(11): 5861-5867.
WANG XM, 2019. Metatranscriptomic analysis of microbial in enrichment culture and Polyphasic Taxonomy Analysis of Three Bacteria Strains[D]. Shandong; Shandong University. [王肖慢，2019，微生物富集培养过程的宏转录组分析及三株新菌的鉴定[D]．山东；山东大学．]
WANG XY, MAO W, GONG GL, 2020. Research progress on antibiotics[J]. J Food Saf Qual, 11(9): 2880-2886. [王旭阳，毛雯，龚国利，2020．抗生素类药物的研究进展[J]．食品安全质量检测学报，11（9）：2880-2886．]
WU JF, WU ST, LI ZM, et al., 2017. Biodiversity and screening of culturable actinobacteria against *Fusarium oxysporum* isolated from mangrove soil in Maowei sea[J]. Chin J Antibiot, 42(4): 294-301. [吴家法，吴思婷，李智鸣等，2017．茅尾海红树林土壤可培养放线菌多样

性及其抗尖孢镰刀菌活性分析[J]．中国抗生素杂志，42（4）：294-301．]

YAMAMURA H, ASHIZAWA H, NAKAGAWA Y, et al., 2011. *Actinomycetospora rishiriensis* sp. nov., isolated from a lichen[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 61(11): 2621.

YAN DM, WANG W, LI M, et al., 2018. Diversity of rhizospheric bacteria and its inhibition activity from *Sonneratia apetala* in Maowei Sea[J]. S Agric, 49(6): 1095-1101. [颜栋美, 王伟, 李蜜，等，2018．茅尾海无瓣海桑根际土壤细菌多样性及抑菌活性分析[J]．南方农业学报，49（6）：1095-1101．]

YE JJ, ZHENG HY, WU Y, et al., 2018. Diversity and antimicrobial activity of actinobacteria isolated from mangrove rhizosphere soil in Maowei Sea of Guangxi [J]. J Pathog Biol, 13 (11): 1221-1226, 1231. [叶景静，郑红芸，吴越，等，2018．广西茅尾海红树林植物根际土壤放线菌多样性及抗菌活性研究[J]．中国病原生物学杂志，13（11）：1221-1226，1231．]

YUE Z, ZHANG HR, BAI F, 2020. The prevalence and drug resistance of five *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones[J]. Chin J Antibiot, 47(3): 270-279. [岳卓，张浩然，白芳，2020.5种铜绿假单胞菌高危克隆的流行及耐药情况[J]．中国抗生素杂志，47（3）：270-279．]

ZHANG RC, HU LQ, YU L, et al., 2015. Isolation, identification and bioactivity of culturable Marine bacteria from sediments of Maowei Sea, Guangxi[J]. Light Ind Sci Technol, 31(4): 84-86. [张荣灿，胡丽琴，余炼等, 2015．广西茅尾海沉积物中可培养海洋细菌的分离鉴定及其生物活性研究[J]．轻工科技，31（4）：84-86．]

ZHANG Y, LIU C, ZHANG J, et al., 2014. Actinomycetospora atypica sp. nov., a novel soil actinomycete and emended description of the genus Actinomycetospora[J]. Ant On Leeuwenhoek, 105(5): 891-897.

ZHENG HY, WU Y, YE JJ, et al., 2019. Diversity and antimicrobial activity of actinobacteria isolate from mangrove rhizosphere mud in Maowei sea, Guangxi[J]. Chin J Antibiot, 44(9): 1020-1028. [郑红芸，吴越，叶景静，等，2019．广西茅尾海红树林根围淤泥放线菌多样性及抗菌活性[J]．中国抗生素杂志，44（9）：1020-1028．]

ZHOU SQ, HUANG XL,HUANG DY, et al., 2010. Rapid extraction of actinomycete DNA by Chelex-100 as PCR amplification template[J]. Biotechnol Bull, 26(2): 123-125. [周双清，黄小龙，黄东益，等，2010．Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]．生物技术通报，26(2)：123-125．]